N° 22. **Georg Benz,** Bern. — Regionale Verteilung der Kathepsinaktivität im Schwanz von gefütterten und hungernden *Xenopus*-Larven [1].

(Aus dem Zoologischen Institut der Universität Bern.)

I. Einleitung.

Die Untersuchungen von Jensen, Lehmann und Weber (1956) und Deuchar, Weber und Lehmann (1957) haben gezeigt, dass die Aktivität der intrazellulären Proteinasen oder Kathepsine im regenerierenden Schwanz der Xenopuslarve stark ansteigt. Die gleichen Autoren fanden auch in den nicht amputierten Kontrollschwänzen eine schwach erhöhte Kathepsinaktivität. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine Erklärung für diesen Anstieg der Proteinasenaktivität im Kontrolltier zu finden.

Die oben erwähnten Autoren hielten die Tiere während der ganzen Versuchsdauer ohne Futter bei 18° C in destilliertem Wasser. Bis zum Versuchsbeginn sind die Tiere bei ca. 21° C gezüchtet worden. Der Temperaturwechsel konnte für den Anstieg der Kathepsinaktivität nicht verantwortlich gemacht werden, da eigene Vorversuche gezeigt haben, dass das Herabsetzen der Temperatur um 3° keinen Einfluss auf die Kathepsinaktivität oder höchstens eine sehr geringe Abschwächung derselben bewirkt.

Es wurde daher die Arbeitshypothese aufgestellt, dass der Nahrungsmangel die erhöhte Kathepsinaktivität der Kontrolltiere bewirke. Jensen et al. und Deuchar et al. haben für ihre Untersuchungen 2 mm lange Schwanzstückchen verwendet, die sie vom 8.—10. mm vor der Schwanzspitze herausgeschnitten hatten. In unseren ersten Versuchen haben wir darum ebenfalls Schwanzstücke von 2 mm Länge untersucht. Da zugleich die Regenerationsfähigkeit der Hungertiere getestet werden sollte, wurden die Stücke

[1] Ausgeführt mit Unterstützung des Schweiz. Nationalfonds. Herrn Prof. F. E. Lehmann danke ich für wertvolle Ratschläge und reges Interesse an dieser Arbeit.

allerdings vom 6.—8. mm vor der Schwanzspitze herausgeschnitten. Später sind die Versuche erweitert worden; es wurden auch ganze Schwänze untersucht, und zur Abklärung der Frage, ob die von den obigen Autoren verwendete Schwanzregion ein gutes Bild über den physiologischen Zustand des Schwanzes geben, wurde die Kathepsinaktivität in den verschiedenen Schwanzregionen bestimmt. Ferner wurde erwartet, dass die Versuche etwas mehr Aufschluss über die Funktion des Kathepsins im lebenden Gewebe ergeben.

II. Material und Methoden.

1. *Zucht und Auswahl der Tiere.*

Xenopuslarven von 26—29 mm Länge, die unter Standardbedingungen gezüchtet worden sind (Lehmann und Bretscher, 1952, Dettelbach, 1954), wurden zu je 5 in Glasbecher mit ca. 200 ml glasdestilliertem Wasser gegeben und pro Glas eine der Grösse der Tiere angemessene Menge Brennesselfutter (75 g Brennesselpulver pro Liter Wasser) zugesetzt. Die für eine Versuchsserie verwendeten Tiere stammten immer von der gleichen Ablage. Es wurde darauf geachtet, dass die Larven in jedem Glas die gleiche durchschnittliche Länge hatten und dass die einzelnen Tiere nicht mehr als 1 mm von diesem Mittelwert abwichen. Die Gläser wurden im 18°-Thermostaten aufbewahrt. Jeden Tag wurde neues Futter zugegeben und jeden zweiten Tag erhielten die Tiere frisches Wasser. Gewöhnlich sind die Tiere 4 Tage lang im 18°-Thermostaten gefüttert worden, bevor mit dem eigentlichen Versuch begonnen wurde (Standard-Konditionierung). Am Tag des eigentlichen Versuchsbeginns (Tag 0 der Hungerversuche) wurde die Hälfte der Tiere in neue Gläser mit frischem glasdestilliertem Wasser umgesetzt, während die übrigen Tieren weiterhin täglich Futter erhielten.

2. *Herstellung der Schwanzhomogenate.*

Schwanzstücke bestimmter Grösse, oder ganze Schwänze, meist von 10 Tieren, wurden in einem konisch geschliffenen Mikrohomogenisator mit wenig Wasser homogenisert und das Homogenat mit einer bestimmten Menge Wasser verdünnt.

3. *Bestimmung des Stickstoffs und der Kathepsinaktivität.*

Von den Homogenaten wurden mit einer Carlsberg-Konstriktionspipette (11,7 µl) Stichproben genommen und zwar gewöhnlich 3 Stichproben für die Stickstoffbestimmung und 5 Stichproben für die Kathepsinbestimmung. Die Homogenate bestimmter Schwanzabschnitte wurden so verdünnt, dass eine Stichprobe ungefähr einer Schwanzschnitte entsprach. Der Stickstoffgehalt wurde nach der Ultramikrokjeldahl-Methode von Boell and Shen (1954) bestimmt. Zur Bestimmung der Kathepsinaktivität wurde die nach Duspiva (1939) modifizierte, kolorimetrische Methode von Anson (1937) mit Casein als Substrat, verwendet. (vgl. Deuchar et al. 1957). Bei dieser Methode wurde pro Ansatz eine Homogenatstichprobe mit 50 µl 2%iger Casein-Harnstoff-Lösung + 50 µl Duspiva-Puffer (pH 4,8—5) gut vermischt und 18 h bei 40° C inkubiert. Das unverdaute Casein wurde hierauf mit 1 ml 5%iger Trichlor-Essigsäure gefällt und abzentrifugiert. Vom Überstehenden wurde 1 ml abpipettiert, mit 1 ml Reagens nach Folin und Cocaltieu und 1 ml 13,5%iger Na_2CO_3-Lösung versetzt und gut gemischt. Nach 1 h wurde die entstandene Blaufärbung mit dem Beckman-Spektrophotometer (Modell B) bei einer Wellenlänge von 780 mµ gemessen. Die Ansätze für die Blindwerte sind gleich behandelt worden, nur ist bei diesen anstatt der Homogenatstichprobe ein entsprechendes Volumen Wasser zugesetzt worden. Zur Umrechnung der Extinktionswerte in Kathepsin-Einheiten (KE) wurde die von Weber (1957b) publizierte Kathepsinumsatz-Kurve verwendet.

III. Experimente und Resultate.

Vorversuche.

1. Versuch: Von je 10 gefütterten resp. gehungerten *Xenopus*larven wurden nach 0, 5, 8, 11, 15, 18 und 21 Tagen das Schwanzstück vom 6.—8. mm vor der Schwanzspitze herausgeschnitten und homogenisiert. Im Homogenat wurden die Kathepsinaktivität und der Stickstoffgehalt pro Stichprobe (entsprechend einer Schwanzschnitte) bestimmt. Durch Umrechnung der gemessenen Kathepsinaktivität in Kathepsin-Einheiten (KE) und Division der KE durch die Stickstoffmenge (µg/Stichprobe) wurde die spezifische Kathepsinaktivität errechnet (SKA = KE pro µg Stickstoff).

Die gefütterten Tiere erhielten täglich vom 0.—8. Tag = 0,25 ml, vom 9.—15. Tag = 0,5 ml und vom 16.—21. Tag = 1 ml Brennesselfutter pro Glas. Abb. 1 zeigt die Resultate dieses Versuchs. Es zeigt sich, dass die SKA in den Hungertieren höher ist als in den gefütterten Tieren, dass sie aber offenbar sehr stark oscilliert (vgl. dazu Abb. 6, Zwischenstück). Die gefütterten Tiere haben etwas zu wenig Futter erhalten; ihre SKA steigt dementsprechend ebenfalls etwas an.

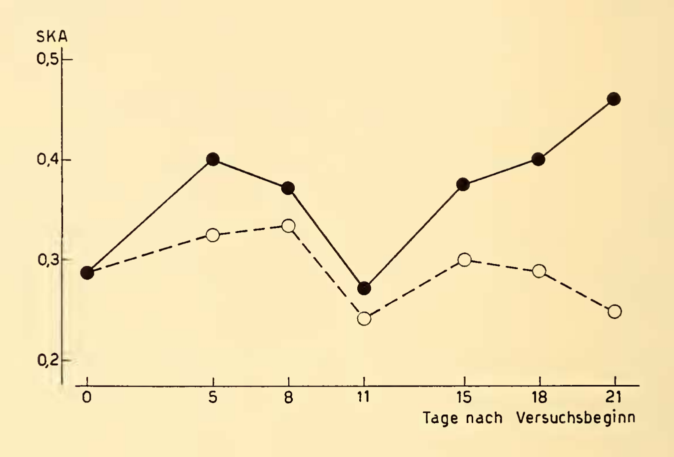


Abb. 1.

Spezifische Kathepsinaktivität in einem 2 mm langen Schwanzstück (6.—8. mm vor der Schwanzspitze) der *Xenopus*larve. ●——● = gehungerte Tiere, ○— — ○ = gefütterte Tiere.

2. V e r s u c h : Von je 5 gehungerten Tieren wurde 0, 5, 8, 11, 18, und 21 Tage nach Versuchsbeginn der ganze Schwanz (18 mm) abgeschnitten und die SKA im Homogenat dieser Schwänze bestimmt. Die Resultate sind in Abb. 3 (Kurve H2) eingetragen. Der Versuch zeigt, dass im Verlauf der Hungerszeit eine Zunahme der SKA im Schwanz erfolgt, wobei auch hier, allerdings viel schwächer als im 1. Versuch, Oscillationen auftreten.

3. V e r s u c h : Schwänze von unbehandelten *Xenopus*larven wurden in einzelne Abschnitte aufgeteilt, in die Schwanzspitze (0.—6. mm) und weiter bis zur Basis in lauter 2 mm lange Schnitten. In den Homogenaten sind die Kathepsinaktivität und der Stickstoff bestimmt worden. Die Ergebnisse sind in Abb. 2 wiedergegeben. Von gleichen Tieren sind Schwanzquerschnitte hergestellt

worden. Unten in Abb. 2 ist für jede Region des Schwanzes der zugehörige Querschnitt eingezeichnet worden. Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass in der Schwanzspitze mehr Kathepsin pro Stickstoff-Einheit vorhanden ist als in der Schwanzbasis und dass zwischen diesen bieden Punkten ein ziemlich gleichmässiges Gefälle der SKA festgestellt werden kann.

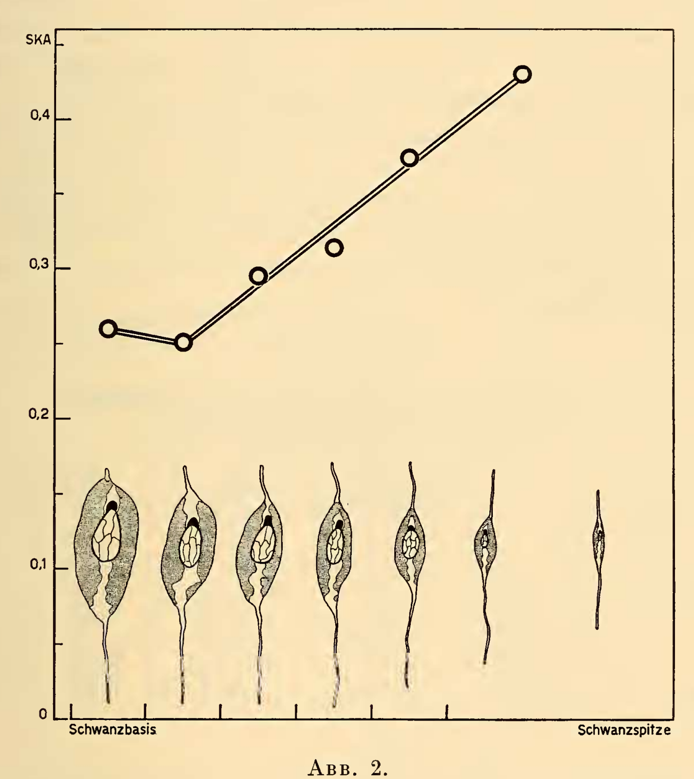


ABB. 2.

Spezifische Kathepsinaktivität in verschiedenen Regionen des Schwanzes von *Xenopus*larven. Unten sind Querschnitte aus den verschiedenen Schwanzregionen eingezeichnet.

4. Versuch: Um das Wachstum, resp. den Stickstoffzuwachs (nach DEUCHAR et al. ist der Stickstoffgehalt direkt proportional dem Trockengewicht) in den verschiedenen Schwanzregionen zu bestimmen, sind die Schwänze von 20 Larven mit Carmin 6, 8, 10, 12, 14 und 16 mm vor der Schwanzspitze markiert worden. Die Carminkörner wurden mit Hilfe einer in einen Glasstab

eingeschmolzenen Minutien-Nadel den narkotisierten Tieren eingestochen.

Die Hälfte der Tiere wurden sofort getötet, die Schwänze an den markierten Stellen entzwei geschnitten und von je 10 gleichen Abschnitten sind Homogenate gemacht und deren Stickstoff bestimmt worden. Die restlichen Tiere wurden während 20 Tagen gefüttert und dann deren Schwänze ebenfalls an den markierten Stellen entzwei geschnitten. Wiederum sind von den einzelnen Schwanzabschnitten Homogenate gemacht und deren Stickstoffgehalt bestimmt worden. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 eingetragen. Wird die Stickstoffmenge der einzelnen Schwanzabschnitte bei den frisch markierten Tieren als 100 angenommen, so ergibt die Stickstoffmenge der entsprechenden Abschnitte von gefütterten Tieren die Stickstoffzunahme in 20 Tagen oder deren Wachstum. Tab. 1 zeigt, dass der Schwanz an der Basis relativ rascher wächst als an der Spitze.

TABELLE 1.

Stickstoffgehalt der verschiedenen Schwanzabschnitte und deren Zuwachs in 20 Tagen.

Schwanzabschnitt	N-Gehalt bei Versuchsbeginn	N-Gehalt nach 20 Tagen	N-Zuwachs	
	in μg	in μg	in μg	in %
Spitze = 0.— 6. mm	4,67	12,45	7,78	166
6.— 8. mm	5,33	13,48	8,14	152
8.—10. mm	9,21	24,41	13,20	164
10.—12. mm	15,58	48,60	33,01	211
basal = 12.—14. mm	36,01	118,39	82,37	228

5. Hauptversuch: Am Tag 0 (Versuchsbeginn), sowie nach 4, 8, 12, 16 und 20 Tagen wurde von je 10 gefütterten resp. gehungerten Tieren der Schwanz amputiert und in die folgenden 4 Abschnitte (vgl. Skizzen in Abb. 7 unten) aufgeteilt: Schwanzspitze (0.—6. mm), Zwischenstück (6.—8. mm), Mittelstück (8.—16. mm) und Schwanzbasis (16. mm—After). Die 10 sich entsprechenden Abschnitte wurden jeweils zu einem Homogenat verarbeitet und von den Homogenaten der Stickstoff und die Kathepsinaktivität bestimmt. Die Resultate sind in den Abbildungen 3—7 und in Tabelle 2 dargestellt.

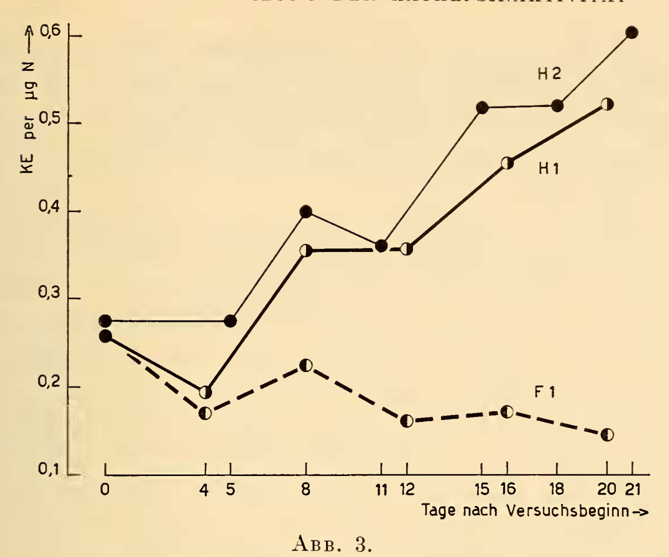


Abb. 3.

Spezifische Kathepsinaktivität ganzer Schwänze von *Xenopus*larven. H 1 und H 2 = Hungertiere. F 1 = gefütterte Tiere.

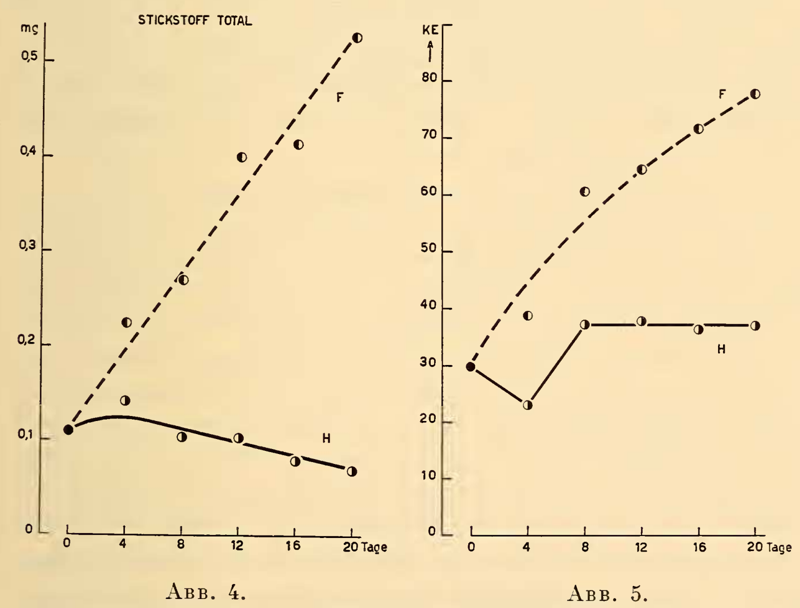


Abb. 4. Abb. 5.

Abb. 4. Stickstoffmenge in Schwänzen von gefütterten (F) und gehungerten (H) *Xenopus*larven.

Abb. 5. Kathepsinmenge in Kathepsineinheiten (KE) in Schwänzen von gefütterten (F) und gehungerten (H) *Xenopus*larven.

Wie die Abb. 3 zeigt, sinkt die SKA des Schwanzes während der ersten 4 Hungertage, steigt dann aber während der weiteren Hungerzeit stark an. Bei den gefütterten Tieren ist während des Wachstums ein schwaches Absinken der SKA festzustellen (vgl. Weber 1957a, b).

Aus Abb. 4 ist ersichtlich, dass der Gesamtstickstoff in den gefütterten Tieren ziemlich linear zunimmt, während er in den Hungertieren schwach abnimmt. Abb. 5 zeigt, dass während des Wachstums der gefütterten Tiere die Kathepsinmenge (ausgedrückt in KE) der Stickstoffmenge entsprechend zunimmt. Ganz anders liegt der Fall bei den Hungertieren. Nach einem anfänglichen Absinken der Kathepsinmenge steigt sie am 8. Hungertag auf einen Wert der etwa 20% höher liegt als der Ausgangswert und bleibt dann konstant. Die fortwährende Zunahme der SKA in den Hungertieren beruht also vom 8. Tag an nicht auf einer Zunahme der absoluten Kathepsinmenge, sondern auf dem Absinken des Stickstoffgehaltes.

Betrachten wir die Werte der einzelnen Schwanzregionen (Abb. 6), so erhellt, dass die hohe SKA des ganzen Schwanzes nach 20 Tagen Hunger vor allem auf die starke Zunahme der SKA in der vorderen Schwanzhälfte zurückzuführen ist. Die Spitze und die anschliessenden 2 mm des Schwanzes weisen im Gegensatz dazu eine sehr starke Oscillation der SKA-Werte auf (vgl. Abb. 1), die auch im grossen Mittelstück noch schwach angedeutet ist.

Wie Abb. 7 zeigt, ist in gefütterten Tieren der starke Gradient der SKA von der Schwanzbasis zur Spitze sehr gut reproduzierbar. Während der ganzen Versuchsdauer sind keine wesentlichen Änderungen in der SKA der verschiedenen Schwanzregionen zu verzeichnen. Ganz anders verhält sich die SKA in Hungerschwänzen. Nach einer Hungerperiode von 8 Tagen ist die SKA im ganzen Schwanz ziemlich stark angestiegen. Nach 12 Hungertagen finden wir in der Schwanzspitze eine stark verminderte SKA, während diese im Basisstück weiterhin ansteigt. Wir finden deshalb am 12. Tag in allen Schwanzregionen eine ungefähr gleich hohe Kathepsinaktivität pro Stickstoffeinheit. Bis zum 20. Hungertag entsteht wieder ein SKA-Gradient, der nun allerdings ein umgekehrtes Gefälle aufweist als derjenige der gefütterten Tiere. Diesen Gradientenverschiebungen entsprechend ist auch der Eiweissabbau in den Schwanzregionen verschieden. Als Mass für den Eiweissabbau

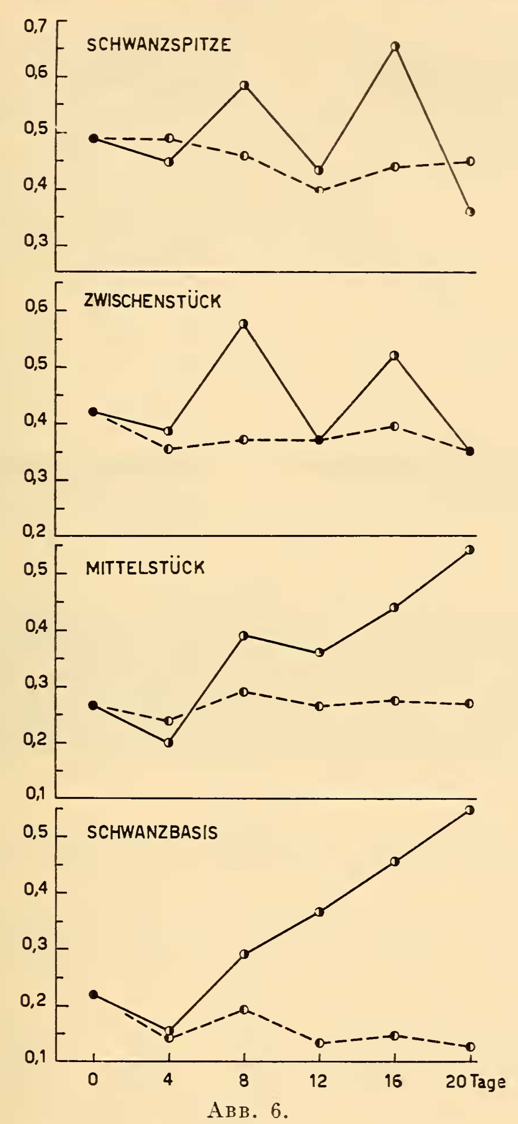


ABB. 6.

Spezifische Kathepsinaktivität (Ordinate) in verschiedenen Schwanzregionen von *Xenopus*larven. ———— Hungertiere, — — — gefütterte Tiere.

kann der Stickstoffverlust im Schwanzgewebe betrachtet werden. Tab. 2 gibt Auskunft über das Ausmass dieser histolytischen Vorgänge. Es zeigt sich, dass in der Schwanzspitze vor allem in den ersten 8 Hungertagen Eiweiss abgebaut wird und dass diese Prozesse im Basisgewebe erst später einsetzen.

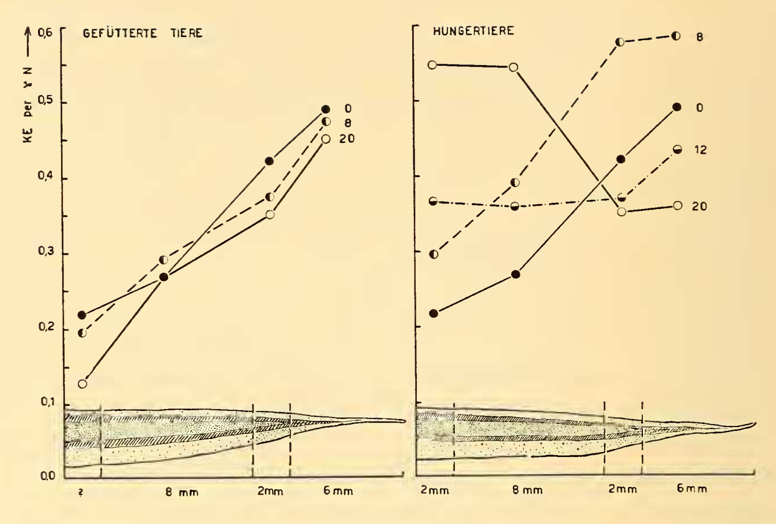


ABB. 7.

Spezifische Kathepsinaktivität (Ordinate) in verschiedenen Regionen des Schwanzes von gefütterten und gehungerten *Xenopus*larven. Unten ist ein Operationsschema eingezeichnet aus dem die Grösse der zur Untersuchung gewonnenen Schwanzstücke abgelesen werden kann. Das Fragezeichen beim Basisstück der gefütterten Tiere bedeutet, dass die Grösse dieses Stückes variiert und zwar nimmt es im Verlauf des Versuches zu. Die Zahlen bei den einzelnen Kurven bedeuten Tage nach Versuchsbeginn.

TABELLE 2.

Stickstoffgehalt der verschiedenen Schwanzregionen in μg nach 0, 8 und 20 Hungertagen.

Schwanzregion	N-Gehalt am Tag 0	N-Gehalt am Tag 8	N-Gehalt am Tag 20	Abnahme in d.ersten 8 Tg.	Spätere Abnahme
Spitze . . .	3,18	2,05	1,97	35%	3%
Zwischenstück	3,20	2,45	2,32	24%	3%
Mittelstück .	60,87	48,96	38,22	20%	17%
Basis	48,01	48,76	27,83	0%	42%

IV. DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG.

Die Kathepsinbestimmungen an Schwänzen von *Xenopus*-larven ergeben folgende Resultate:

1. Die spezifische Kathepsinaktivität (S. 339) ist in den verschiedenen Schwanzregionen verschieden hoch. Von der Basis,

mit relativ niedriger SKA, verläuft ein ziemlich rasch zunehmender SKA-Gradient zur Spitze (Abb. 2 + 7). An den Querschnitten aus den verschiedenen Schwanzregionen (Abb. 2) ist ersichtlich, dass der Schwanz an der Basis aus relativ wenig Epidermis, an der Spitze aber fast nur aus Epidermis besteht. Die Epidermis enthält, verglichen mit der Muskulatur und dem Stützgewebe, relativ viele Kerne. Es ist denkbar, dass die Kathepsinaktivität mit dem Kernreichtum in direktem Zusammenhang steht.

2. Werden die Tiere gehungert, so steigt die SKA in den Schwänzen an. Dieser Anstieg beruht nicht in erster Linie auf einer Zunahme des Kathepsins (Abb. 5), sondern auf dem Stickstoffverlust (Abb. 4). Vom 8. Hungertag an bleibt die absolute Kathepsinaktivität konstant. Der Anstieg der SKA erfolgt während der Hungerzeit (ausgenommen sind die ersten 4 Tage) relativ konstant in der Basishälfte des Schwanzes. Im Gegensatz dazu zeigt die SKA in der Schwanzspitze regelmässige Oszillationen. Da die Schwanzspitze einer lebenden *Xenopus*larve in dauernder Bewegung ist, dürfte der Stoffwechsel in dieser Region entsprechend intensiver sein. Die Oszillationen der SKA könnten auf einem spezifischen Spitzenstoffwechsel beruhen. In gefütterten Tieren zeigt die SKA nur geringe Schwankungen. Im Verlaufe des Wachstums sinkt die SKA etwas (vgl. Weber 1957 a, b).

3. Die relative Stickstoffzunahme, d. h. das Wachstum, ist an der Basis relativ gross und an der Spitze relativ gering (Tab. 1). Umgekehrt weist die Spitze während den ersten 8 Hungertagen einen stärkeren Stickstoffverlust auf als die Basis. Später, wenn die Basis eine hohe SKA erreicht hat (Abb. 7), ist der Stickstoffverlust vor allem im Basisbereich gross (Tab. 2). Wir finden also in der Region hoher SKA relativ geringes Wachstum bei gefütterten Tieren und relativ grossen Stickstoffverlust bei Hungertieren. Dies spricht dafür, dass das von uns bestimmte Kathepsin in *Xenopus*larven vor allem am Abbau der Proteine beteiligt ist. Für die von Løvtrup (1955)und Urbani (1955) vertretene Ansicht, wonach Kathepsin in Amphibien auch synthetische Funktionen habe, bieten unsere Versuche keine Anhaltspunkte. Diese Feststellung stimmt mit den Ergebnissen von Weber (1957 b) über die Kathepsinaktivität im Schwanz der Metamorphosestadien von *Xenopus* überein. Das oben gesagte gilt aber nicht für alle Kathep-

sine. So haben Untersuchungen von Schultz (1949) und Fruton et al. (1953) gezeigt, dass Kathepsin II, resp. eine Komponente davon, Kathepsin C im Organismus eventuell synthetische Funktionen hat.

Summary.

In homogenates from whole tails or slices of the tail from fed and starved larvae of *Xenopus* the quantity of nitrogen (method of Boell and Shen, 1954) and the catheptic activity (colorimetric method of Anson, 1937, modified by Duspiva, 1939) have been determined. The following results were obtained:

1. The specific catheptic activity (SCA), i. e. catheptic activity per unit nitrogen, is highest in the tip and lowest in the base of the tail.
2. The SCA in tails of starved animals is higher than that in fed animals. It rises during the period of starvation.
3. The increase of SCA is rather steady in the anterior part of the tail, whereas the tip shows strong oscillations.
4. There is no great increase of cathepsin in starved animals. The higher SCA is the result of loss of nitrogen, whereas the amount of cathepsin remains constant.
5. In fed animals the increase of nitrogen and cathepsin runs nearly parallel.
6. The relative increase of nitrogen in fed animals is small in the tip of the tail and high in the base. In contrast to this the loss of nitrogen in starved animals is great in tail regions with high SCA and vice versa.
7. These facts lead to the conclusion, that in vivo the described cathepsin of the larval tail of *Xenopus* is very probably involved in proteolysis but not in synthesis.

LITERATUR

Anson, M. L. 1937. *The estimation of cathepsin with hemoglobin and partial purification of cathepsin.* J. gen. Physiol. 20: 565.

Boell, E. J. and S. C. Shen. 1954. *An improved ultramicro-Kjeldahl technique.* Exp. Cell. Res. 7: 147.

Dettelbach, H. R. 1952. *Histostatic and cytostatic effects of some amino ketones upon tail regeneration in Xenopus larvae.* Rev. suisse Zool. 59: 339.

Deuchar, E. M., R. Weber and F. E. Lehmann, 1957. *Differential changes of catheptic activity in regenerating tails of Xenopus larvae, related to protein breakdown and total nitrogen.* Helv. Physiol. Acta 15: (im Druck).

Duspiva, F. 1939. *Beiträge zur Histophysiologie des Insektendarmes. I. Untersuchungen über die Verteilung der proteolytischen Enzyme sowie der Sekret- und Resorptionszellen im Darm von Dytiscus marginalis.* Protoplasma 32: 211.

Jensen, P. K., F. E. Lehmann and R. Weber, 1956. *Catheptic activity in the regenerating tail of Xenopus larvae and its reaction to histostatic substances.* Helv. Physiol. Acta 14: 188.

Lehmann, F. E. und A. Bretscher. 1952. *Wirkungsanalyse regenerationshemmender Stoffe mit Hilfe statistischer Methoden.* Helv. Physiol. Acta 10: 20.

Løvtrup, S. 1955. *Chemical differentiation during amphibian embryogenesis.* C. R. Lab. Carlsberg, Sér. Chim. 29: 261.

Urbani, E. 1955. *Gli enzimi proteolitici nella cellula e nell'embrione.* Exper. 11: 209.

Weber, R. 1957*a*. *On the biological function of cathepsin in tail tissue of Xenopus larvae.* Exper. 13: *153.*

— 1957*b*. *Die Kathepsinaktivität im Schwanz der Xenopuslarve während Wachstum und Metamorphose.* Rev. suisse Zool. 64: 326.

N° 23. **H.-A. Guénin,** Lausanne. — Contribution à la connaissance cytologique des Scorpions: les chromosomes de *Pandinus imperator* Koch. (Avec 9 figures dans le texte.)

(Laboratoire de Zoologie et d'Anatomie comparée de l'Université.)

Les scorpions constituent un matériel de choix pour l'étude cytologique par le fait que, malgré le peu d'espèces explorées du point de vue qui nous intéresse, leur garniture chromosomique se révèle très variée. Il apparaît en effet, à la suite de diverses